

Original document

6.

**CHEMICALLY MODIFIED PEPTIDE HORMONE**

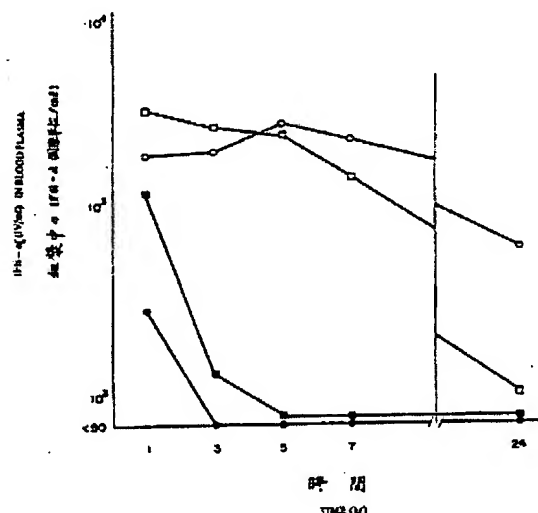
Patent number: JP61178926  
 Publication date: 1986-08-11  
 Inventor: NISHIMURA TADASHI; FUJINO MASAHIKO  
 Applicant: TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD  
 Classification:  
 - international: **C07K1/107; C07K14/52; C07K14/55; C07K14/56; C07K14/57; A61K38/00; C07K1/00; C07K14/435; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/02; A61K37/26**  
 - european:  
 Application number: JP19850027283 19850213  
 Priority number(s): WO1984JP00085 19840306

Also published as:

WO8503934 (A1)  
 WO8503868 (A1)  
 JP60226821 (A)

View INPADOC patent familyReport a data error here**Abstract of JP61178926**

**PURPOSE:**The titled hormone obtained by bonding directly a polyoxyethylene group to at least one primary amino group in the molecule. **CONSTITUTION:**A group shown by the formula (R is terminal oxygen-protecting group such as alkyl, alkanoyl, etc.; n is positive number) is directly bonded to at least one primary amino group in the molecule, to give a chemically modified peptide hormone. Peptide hormone is a general term of a substance which obtained by bonding two or more amino acids by peptide bond, has  $\leq 100$  amino acids, and has activity such as metabolic regulation, antiviral action, antitumor action, etc. For example, insulin, ACTH, gastrin, calcitonin, etc. may be cited. The peptide hormone of this invention has 500-10,000, especially 3,000-8,000mol.wt. The group shown by the formula has  $\leq 25,000$ , especially 250-6,000mol.wt. **EFFECT:**The peptide hormone has retarded clearance and shows effectively its activity for a long period and has low toxicity and antigenicity.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A) 昭61-178926

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 37/02  
37/26識別記号 庁内整理番号  
7138-4C  
7138-4C

⑬ 公開 昭和61年(1986)8月11日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 化学修飾ペプチドホルモン

⑯ 特 願 昭60-27283

⑰ 出 願 昭60(1985)2月13日

優先権主張 ⑱ 1984年3月6日 ⑲ 世界知的所有権機関(WO) ⑳ PCT/JP84/00085

㉑ 発 明 者 西 村 紀 豊中市東豊中町5-2番123-502号

㉒ 発 明 者 藤 野 政 彦 宝塚市雲雀丘2丁目10番7号

㉓ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

㉔ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

化学修飾ペプチドホルモン

## 2. 特許請求の範囲

分子中の少なくとも1個の一级アミノ基に、  
 $R-OCH_2CH_2-\frac{n}{n}$  基 (Rは末端酸基の保護基、n  
は任意に変わりうる正の整数)を直接結合してな  
る化学修飾ペプチドホルモン。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、化学修飾ペプチドホルモンに関する。

## 従来の技術

近年、遺伝子組み換え技術やペプチドの有機合  
成法の発展とともに、ペプチドホルモンを大量  
に合成することが可能になってきた。しかしなが  
ら、生体に投与されたペプチドホルモンの生体内  
におけるクリアランスは、一般に非常に早いこと  
が知られている。またペプチドホルモンが異種動  
物から得られたもので若干構造の異なるものであ  
る場合には、場合により、抗体が産生され、重篤

な症状を引き起こす危険が予想される。従って、  
これらを医薬として用いるに際しては、その活性  
を保持したまま、クリアランスを遅延させ、さら  
にその抗原性を減弱させる技術の開発が望まれて  
いる。この目的を達成するために、ペプチドホル  
モンを化学的に修飾する方法はきわめて有効な手  
段である。すなわち化学修飾によって、上記の生  
体内におけるクリアランスの遅延、抗原性の減弱、  
さらには生理活性の増強が期待され、ペプチドホ  
ルモンの化学修飾の実用的意義はきわめて大きい。

## 発明が解決しようとする問題点

一般に生理活性ペプチドの化学修飾を行うにあ  
たっては、それらの生理活性を保持したまま、化  
学修飾を行ない得る方法が必要である。ポリエチ  
レングリコールメチルエーテルは、このものの自体  
が抗原性を有しないと考えられているため、蛋白  
質やペプチドの化学修飾に用いられているが、該  
物質の蛋白質、ペプチドへの導入は塩化シアメル  
を用いる方法が一般的である。しかしながら、同  
時に結合基として導入される塩化シアメルはそれ

自体安全性に問題があり、かつまたその生体内における分解物の安全性についても解明されておらず、その使用は慎重を期す必要がある。また反応に際しても、アルカリ側の pH を必要とし、アルカリ性で失活しやすい蛋白質やペプチドに関しては、本法を適用できない欠点がある。

また米国特許第 4,002,581 号は酵素のモノアルキルポリエチレングリコール誘導体の製造法を開示しているが、そこに開示された pH 8.5 で水素化ホウ素ナトリウムを用いる方法をペプチドホルモンに適用すると、その生理活性を失活させるおそれがあり有効な製造法とはなり得ず、さらに該特許文献は酵素誘導体の生体内におけるクリアランスの遅延効果に關し示唆すらなく、その効果については不明である。

さらに、生理活性蛋白質にホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、ベンツアルデヒド、ピリドキサルなどの低分子のアルデヒドをホウ素系還元剤の存在下に導入する方法〔メソッド イン エンザイモロジー、第 47 巻、469-478 頁

微生物の接合促進などの活性を有する物質を総称する。

すなわち、ペプチドホルモンは遺伝子工学産物、ヒトを含む各種動物由来のもの、合成品等いずれでもよく、さらにこれらと類似構造を有し、同様の生理活性を有する物質をも包含する。

なかでもアミノ酸数が 2~50 個、とりわけ 10~30 個のペプチドホルモンが好ましい。

具体的には例えば、インスリン、ACTH、ガストリン、カルシトニン、エンドルフィン、グルカゴン、ソマトスタチン、ウロガストロン、成長ホルモン放出因子 (GRF)、コルチコトロピン放出因子 (CRF) やこれらの誘導体などが挙げられる。

本発明におけるペプチドホルモンはその分子量が 500~10,000、とりわけ 8,000~8,000 であることが好ましい。

ペプチドホルモンの一般アミノ基として、R 末端の α-アミノ基およびリジン残基の ε-アミノ基が挙げられる。

(1977)〕；特開昭 58-154596 号公報〕が知られている。しかしながら当該方法をペプチドホルモンに適用しても有効なクリアランスの遅延化は達成されず、抗原性の低下は期待されないのみならず、導入された低分子のアルデヒドがヘプテンとして作用して該ペプチドホルモンに免疫原性を与える可能性がある。

本発明者らは、これらの欠点を解決すべく、鋭意研究を行ない、本発明を完成した。

#### 問題を解決するための手段

本発明は、分子中の少なくとも 1 個の一般アミノ基に、 $R-(O-CH_2-CH_2)_n-$  基 (I: R は末端酸基の保護基、n は任意に変わりうる正の整数) を直接結合してなる化学修飾ペプチドホルモンを提供するものである。

本願明細書において、ペプチドホルモンは 2 個以上のアミノ酸がペプチド結合によって結合したもので、アミノ酸数が 100 以下で代謝調節 (記憶、睡眠、血糖値、血圧、免疫)、抗菌、抗ウイルス、抗腫瘍、抗昆虫、毒、味、酵素活性阻害、

上記 (I) で表わされる基に關し、R で示される末端酸基の保護基としては、アルキル、アルカノイルなどが挙げられ、アルキルとして具体的には、 $C_1-16$  のもの、とりわけメチル、エチル、プロピル、1-プロピル、ブチル、1-ブチル、2-ブチル、3-ブチルなど低級 ( $C_1-4$ ) アルキルが好ましい。アルカノイルとして具体的には、 $C_1-8$  のもの、とりわけホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、1-ブチリル、カプロイルなど低級 ( $C_1-8$ ) アルカノイルが好ましい。n で表わされる正の整数は、500 以下、とりわけ 7~120 が好ましい。

式 (I) で表わされる基の分子量として 2.5 万以下、とりわけ 350~6000 のものが好ましい。生理活性の維持およびクリアランス遅延化効果の面からペプチドホルモンの分子量の 3~150 %、好ましくは 5~100 %、とりわけ 10~85 % の分子量を有する式 (I) で表わされる基が挙げられる。

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、ペプチ

ドホルモンの一級アミノ基の少なくとも一部に直接結合した式 (I) で表わされる基を有するものである。

一級アミノ基としてN末端α-アミノ基のみを有する場合は、そのアミノ基に直接結合した式 (I) で表わされる基を有するものである。またペプチドホルモン分子中に1個以上のリジン有する場合は、そのε-アミノ基の一部に、好ましくはそれらε-アミノ基の15~80% (平均) に、直接結合した式 (I) で表わされる基を有するものであり、この場合、N末端α-アミノ基は、直接結合した式 (I) で表わされる基を有しても、有しなくてもよい。

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、例えばペプチドホルモンと  $R(O-CH_2CH_2)_n-O-CH_2CHO$  (II: Rおよびnは前記と同意義) で示されるアルデヒドとを還元剤の存在下反応させることにより製造することができる。

本反応に用いるホウ素系還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウ

ムなどが挙げられるが、中でもシアノ水素化ホウ素ナトリウムが反応の選択性や中性付近で反応が行なえる点でより好ましい。

反応に際しては、アルデヒド (II) をペプチドホルモンに対して、1~10,000倍モル程度、ホウ素系還元剤はアルデヒド (II) に対して1~100倍モル程度用いればよく、ペプチドホルモンとアルデヒド (II) のモル比を増減することによって修飾の程度を任意に選択することができる。反応に用いる溶媒は、反応を妨害しないものであればいずれでもよいが、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝液が挙げられる。また、ペプチドホルモンを失活させず、反応の支障にならない低級アルコール (例、メタノール、エタノール、1-プロパノール)、アセトニトリルなどの有機溶媒を添加してもよい。反応のpHは3~14の広い範囲で可能であるが、中性付近 (pH 6.5~7.5) が望ましい。反応温度は0°~80℃でペプチドホルモンが失活しない温度であれば、いずれでもよいが、0°~50℃の範囲がより好

ましい。反応時間は0.5~72時間、通常は3~30時間程度で十分である。反応液は、透析、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動等通常の蛋白質の精製法で精製し、所望の化学修飾ペプチドホルモンを得ることができる。またアミノ基の修飾の程度は、例えば酸分解のあと、アミノ酸分析を行なって算出することができる。

前記したアルデヒド (II) は、例えば  $R(O-CH_2CH_2)_nOH$  (III: Rおよびnは前記と同意義) で示されるエチレングリコール誘導体から製造できるが、下記の方法は、対応するカルボン酸の副成が少なく有利な製造法である。

すなわち、化合物 (III) を塩化メチレン、クロロホルムなどハロゲン化アルキル溶媒中、クロロクロム酸ピリジニウムで酸化する。この場合、クロロクロム酸ピリジニウムを化合物 (III) に対し1~3モル量用い、-10°~50℃、好ましくは室温で、1~30時間反応させる。

また化合物 (III, 但しn=1) をn-ブタノ-

ール中でカリウムt-ブトキシドで処理した後、プロモアセタールを反応させ、ついで有機酸 (トリフルオロ酢酸など) または無機酸 (塩酸、硫酸など) などの酸で処理することにより化合物 (III) より  $-OCH_2CH_2-$  鎖長の長い対応するアルデヒド (II) を製造することができる。この場合、まずカリウムt-ブトキシドを上記化合物 (III) に対し10~30モル量を加えて溶解させ、これにプロモアセタールを化合物 (III) に対し3~15モル量加えて、10°~80℃で0.5~5時間反応させ、常法により後処理後、上記酸の希薄水溶液に溶かし、5分~2時間加熱する。

上記いずれの反応液も、抽出、濃縮、再結晶、再沈澱、クロマトグラフィー、蒸留など通常の化学的処理により精製することができる。

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、対応する公知の非修飾ペプチドホルモンと同様の有用な生体活性を有し、医薬品などとして有用である。

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、対応する公知の非修飾ペプチドホルモンに比し、生体内

におけるクリアランスが遅延され、長時間有効にその活性を示すのみならず、毒性、抗原性も低く、公知のペプチドホルモンと同様の目的に、同様の用法で安全に使用することができる。

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、通常自体公知の担体、希釈剤等を用い適宜の医薬組成物として経口的または非経口的に哺乳動物（サル、イヌ、ブタ、ウサギ、マウス、ヒト）に投与することができる。

例えば、本発明の化学修飾インスリンを血糖降下薬として使用する場合、成人1日1回10～100単位を筋注により投与するのがよい。

本明細書中、アミノ酸に関し略号で表示する場合は、IUPAC-IUB (Commission of Biological Nomenclature) による略号に基づくものである。

#### 作用および実施例

以下の実施例および参考例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

解物（6N塩酸，110℃，24時間）中のアミノ酸分析値：Lys, 0.92(1); His, 2.12(2); Arg, 1.08(1); Asp, 3.20(3); Thr, 2.11(2); Ser, 2.86(3); Glu, 7.88(7); Pro, 1.11(1); Gly, 3.78(4); Ala, 2.16(2); Half Cys, 6.08(6); Val, 3.67(4); Ile, 1.78(2); Leu, 6.17(6); Tyr, 4.04(4); Phe, 2.09(2) ブタインスリンのPheは本来3個であるが、B鎖N末端のPheが、ポリエチレングリコールメチルエーテルで修飾され1個少なくなっている。またグルコース低下作用はブタインスリンの約50%であった。

(ii) 参考例1で得た平均分子量1900および750のポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドを用いてブタインスリンを同様に処理し、上記(i)と同じくB鎖のN末端Pheのα-アミノ基が平均分子量1900および750のポリエチレングリコールメチルエーテルで修飾されたインスリン誘導体が得られた。平均分子量1900のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾イ

#### 実施例1. B1-ポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンの製造

(i) ブタインスリン150mgを20mlの水に懸濁し、これに一規定塩酸を一滴ずつ加え、インスリンを溶解させた。そのうち0.4Mリン酸緩衝液(pH 7.0)20mlを加え、最終的に0.2Mリン酸緩衝液とした。これに参考例1(i)で得たポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒド(平均分子量5000)1.125gを加え、ついでシアノ水素化ホウ素ナトリウム100mgを加えて、37℃で24時間かきまぜた。反応液を水に対して12時間透析し、ついで内容物をカルボキシメチルセルロースのカラム(8.0×23.0cm)に注いだ。カラムを水で洗ったのち、水(500ml)と0.2M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 6.8)の間で、対数勾配をかけて溶出した。主溶出画分(320～400ml)を集め凍結乾燥した。ついでバイオゲルP-30のゲル透過に付し、0.1規定酢酸で展開した。主溶出画分(110～150ml)を集めて凍結乾燥した。収量132mg、酸分

ンスリンの酸分解物(6N塩酸，110℃，24時間)中のアミノ酸分析値：Lys, 0.98(1); His, 2.09(2); Arg, 1.09(1); Asp, 3.17(3); Thr, 2.04(2); Ser, 2.89(3); Glu, 7.60(7); Pro, 1.09(1); Gly, 3.76(4); Ala, 2.03(2); Half Cys, 3.93(6); Val, 3.27(4); Ile, 1.54(2); Leu, 5.87(6); Tyr, 3.88(4); Phe, 2.00(2)

平均分子量750のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンの酸分解物(6N塩酸中，110℃，24時間)中のアミノ酸分析値：Lys, 1.03(1); His, 2.18(2); Arg, 1.12(1); Asp, 3.30(3); Thr, 2.15(2); Ser, 3.13(3); Glu, 7.83(7); Pro, 1.17(1); Gly, 4.04(4); Ala, 2.24(2); Half Cys, 5.48(6); Val, 3.26(4); Ile, 1.58(2); Leu, 6.30(6); Tyr, 4.03(4); Phe, 2.23(2)

(iii) グルコース低下作用は文献記載〔Z. ファルティンエヘミー，第252巻，224頁(1970)〕の方法で方法で測定すると平均分

子量1900のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンがブタインスリンの85%、平均分子量750のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンが100%であった。

(iv) 血中クリアランスの測定

ストレプトゾトシン(50mg/kg)をBDラット(雄, 7週令)に静脈内注射し、その3日後20時間絶食したラットの腹腔内にブタインスリン、平均分子量5000および1900のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリン(インスリンとして0.3単位/kg)をそれぞれ投与して、尾静脈から採血し、血糖の経時変化を測定した。結果を第1図に示す。

実施例2. B1-アルカノイルポリエチレングリコール修飾インスリンの製造

参考例2で得た平均分子量1500のアセチルポリエチレングリコールアルデヒドを用いてブタインスリンを実施例1と同様に反応し、B鎖のN末端Pheの $\alpha$ -アミノ基が平均分子量1500のアセチルポリエチレングリコールで修飾されたイ

(10g, 平均分子量5,000)を三級ブタノール(100ml)に溶かし、カリウム三級ブトキシド(4.17g)を加え、ついでブromアセタール(2.56ml)を加え、40℃で2時間かき混ぜた。三級ブタノールを減圧下留去し、残留物に水を加え、ついでクロロホルム(200ml×2)で抽出した。水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを減圧下留去し、残留物に石油ベンゼンを加え、生ずる結晶性残渣をろ取し、エーテルで洗浄して対応するポリエチレングリコールメチルエーテルジエチルアセタール9.5g(95%)が得られた。この内5gを取り、0.05Mトリフルオロ酢酸50mlに溶かし、沸とう水中で30分間処理したあと凍結乾燥し、(i)で得たものよりも $-O-CH_2CH_2$ だけ鎖長の長いポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドが得られた。

(iii) ポリエチレングリコールメチルエーテル(5.7g, 平均分子量1,900)を塩化メチレン(100ml)に溶かし、クロルクロム酸ピリジニウム(970mg)を加え、室温で12時間かきま

ンスリン誘導体が得られる。

参考例1 ポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドの合成

(i) ポリエチレングリコールメチルエーテル(5g, 平均分子量5,000)を塩化メチレン(100ml)に溶かし、クロルクロム酸ピリジニウム(330mg)を加え、室温で12時間かき混ぜた。反応液を2倍量の塩化メチレンでうすめて、フロリジルのカラム(6×10cm)に注ぎ込み、カラムを塩化メチレン、ついでクロロホルムで洗ったのち、メタノール-クロロホルム(1:9)で溶出した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンテストで陽性の固分を集めて、溶媒を減圧留去し、結晶性のワックスを得た。収量1.5g(30%)、薄層クロマトグラフィー: Rf = 0.08 (クロロホルム: メタノール: 酢酸 = 9:1:0.5, シリカゲル),  $^{13}C-NMR$ で96.2ppmに水和した型( $-CH(OH)_2$ )でアルデヒド基の吸収を認めた。

(ii) ポリエチレングリコールメチルエーテル

ぜた。反応液を塩化メチレンで希釈し、フロリジルのカラム(6.0×10.0cm)に注ぎ込み、カラムを塩化メチレン、ついでクロロホルムで洗ったあと、10%メタノール/クロロホルムで溶出した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンテストで陽性の固分を集めて、溶媒を留去すると結晶性のワックスを得た。収量1.8g(30%)、薄層クロマトグラフィー: Rf = 0.10 (クロロホルム: メタノール: 酢酸 = 9:1:0.5, シリカゲル)  $^{13}C-NMR$ で96.2ppmに水和した形( $-CH(OH)_2$ )でアルデヒド基の吸収を認めた。

(iv) ポリエチレングリコールメチルエーテル(19.5g, 平均分子量1,900)を三級ブタノール(100ml)に溶かし、カリウム三級ブトキシド(10.4g)を、ついでブromアセタール(6.4ml)を加え、40℃で2時間かき混ぜた。三級ブタノールを減圧で留去し、残留物に水を加え、ついでクロロホルム(200ml×2)で抽出した。反応液を水洗、ついで無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを減圧下留去し、残留

物に石油ベンジンを加え、生ずる結晶性残留物をろ取し、エーテルで洗浄しアセタール8.5g (89.5%)を得た。この内3gを0.05Mトリフルオロ酢酸に溶かし、沸とう水中で30分間処理したあと、凍結乾燥し、(11)で得たものよりも $-O-CH_2CH_2-$ だけ鎖長の長いポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドが得られた。

(v) 平均分子量750, 550, 350のポリエチレングリコールメチルエーテルを上記と同様の方法で対応するアルデヒドに導いた。

#### 参考例2 アルカノイルポリエチレングリコールアルデヒドの合成

(1) 平均分子量1500のポリエチレングリコール1540 (和光純薬製) 15gをピリジン50mlに溶かし無水酢酸1.85mlを添加し、かきまぜながら40℃で2時間、さらに室温で16時間反応させ、反応後、溶媒を減圧留去した。クロロホルムに溶解し、水洗後、クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、クロロホルムを減圧留去した。残留物を少量のクロロホルムに溶解し、

ロム酸ピリジニウムで酸化してアルデヒド体を得た。

#### 発明の効果

本発明の化学修飾ペプチドホルモンは、ペプチドホルモンとしての生理活性を維持した上で、生体内でのクリアランスが遅延化されまた抗原性が低下されている。

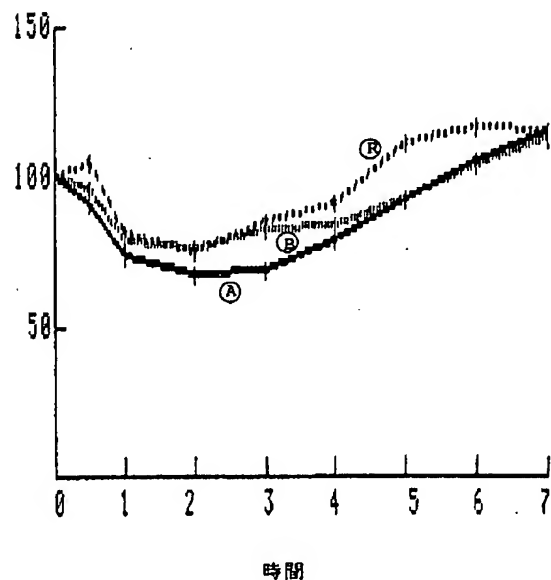
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1 (1v)に開示したラット血漿中のクリアランス遅延化効果を示す。①および②は実施例1で得たそれぞれ平均分子量1900および5000のポリエチレングリコール修飾インスリンの、③は対照としたブタインスリンの測定結果を示す。

代理人 井理士 天 井 作



血中グルコース濃度 (%: 0時間を100%とする)



代理人 井理士 天 井 作 次